



Scientia Agropecuaria

Sitio en internet: www.sci-agropecu.unitru.edu.pe

Facultad de Ciencias
Agropecuarias

Universidad Nacional de
Trujillo

Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y suelos de invernadero

Diversity of enterobacteria associated with tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits and greenhouse soils

M. Lorena Luna-Guevara¹; Adriana Delgado-Alvarado^{2,*}; B. Edgar Herrera-Cabrera²; Alfredo G. Torres³; Fabiola Avelino-Flores⁴; Armando Navarro-Ocaña⁵; Franceline Parada-Guerra¹

¹ Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio s/n Puebla, México.

² Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, Km. 125.5 Carretera Federal México-Puebla, México.

³ Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA

⁴ Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio s/n Puebla, México.

⁵ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. México.

Recibido 10 febrero 2012; aceptado 06 abril 2012

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de enterobacterias presentes en suelo y tomates provenientes de tres invernaderos de fertirrigación. Estos sistemas de cultivo son una alternativa importante de producción en agricultura protegida, sin embargo, existe escasa información acerca de la calidad microbiológica de los frutos y su relación con las características químicas del suelo. Las evaluaciones del suelo consistieron en analizar el contenido de materia orgánica y pH. En los análisis microbiológicos se aislaron e identificaron enterobacterias en muestras compuestas de suelo y frutos con diferentes grados de madurez (0, 50 y 100%), utilizando medios de cultivo selectivos, diferenciales y pruebas confirmatorias con el sistema VITEK. Los patógenos de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y enterotoxigénica (ETEC) se caracterizaron genotípicamente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificándose los genes *bfpA* y *lngA*. Con las especies identificadas se calcularon los índices de diversidad Simpson (D) y Shannon-Wiener (H') y estimador de Chao (S_{Chao1}). Las especies *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *C. brakii* presentaron mayor frecuencia de aislamiento, EPEC y ETEC fueron identificadas en muestras de suelo y en frutos con 100% de madurez. En suelo, los porcentajes de materia orgánica se correlacionaron positivamente con los índices H'. En fruto, aunque H' y D reflejaron comunidades bacterianas menos diversas, el aislamiento de ETEC y *Shigella boydii* sobre la superficie del fruto comprometen su inocuidad debido a que habitualmente se consume en forma cruda.

Palabras clave: Enterobacterias, índices de diversidad, materia orgánica, suelo, tomate.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the diversity of *Enterobacteriaceae* present in soil and tomato fruits from three greenhouses with fertirrigation system. These crop systems are an important alternative for production in protected agriculture; however, there is little information about the microbiological quality of the fruit and its relationship with chemical soil characteristics. Soil evaluations consisted of analyzing organic matter content and pH. In the microbiological analysis were isolated and identified enterobacteria organisms from composite samples of soil and fruits at different stages of maturity (0, 50 and 100%). Culture media used was selective, differential and confirmatory testing with VITEK system. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) were characterized genotypically, amplifying the *lngA* and *bfpA* genes by the technique of polymerase chain reaction (PCR). Diversity index (Simpson (D), Shannon-Wiener (H') and Chao estimator (S_{Chao1}) were calculated with the identified species. The species *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *C. brakii* had a higher frequency of isolation, EPEC and ETEC were identified in soil samples and in fruits with 100% maturity. In soil, H' indices were positively correlated with the highest organic matter percentages. In fruit, although H' and D showed less diverse bacterial communities, the isolation of ETEC and *Shigella boydii* on the fruit surface compromise their safety because they are usually consumed raw.

Keywords: Enterobacteriaceae, diversity indices, organic matter, soil, tomato.

* Autor para correspondencia

Email: adah@colpos.mx (A. Delgado-Alvarado).

1. Introducción

El consumo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en forma fresca se reconoce por su aporte en compuestos “bioactivos” como vitaminas, flavonoides y licopeno (Leonardi *et al.*, 2000; Raffo *et al.*, 2002; Willcox *et al.*, 2003). Las propiedades antioxidantes de estos compuestos se encuentran asociadas con la prevención de enfermedades de tipo carcinogénicas y cardiovasculares (Brandt *et al.*, 2006; Juroszek *et al.*, 2009); sin embargo, la ingesta segura de este fruto crudo puede verse afectada por la presencia de microorganismos patógenos tales como: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* entérica serovar Montevideo y los patógenos de *Escherichia coli*. Estas especies se han asociado con múltiples brotes de enfermedades gastrointestinales (Escartín, 2000; Beuchat, 2002; Harris *et al.*, 2003; Smith y Fratamico, 2005; Berger *et al.*, 2010; Iturriaga *et al.*, 2007) y pueden coexistir con la microbiota autóctona del fruto, conformando con ello una comunidad bacteriana diversa (Begon *et al.*, 1990). Cabe mencionar que estos microorganismos tienen la capacidad de alojarse tanto en la parte externa como interna del fruto (Guo *et al.*, 2001); reduciendo con ello la eficacia de los procesos de lavado y desinfección previos al consumo (Luna *et al.*, 2006).

Entre las diversas fuentes potenciales de contaminación durante el cultivo y cosecha del tomate que pueden poner en riesgo la calidad microbiológica del fruto se encuentran: el agua de riego y suelos de cultivo contaminados (Beuchat, 2002; Iturriaga *et al.*, 2007); prácticas de cultivo y recolección inadecuadas (Mukherjee *et al.*, 2006; Orozco *et al.*, 2008).

Con base en los antecedentes mencionados, esta investigación se propuso como objetivo determinar la diversidad de las enterobacterias presentes en suelo y en fruto de tomate con diferentes grados de madurez cultivados en invernadero en sistema de fertirrigación. Los análisis

microbiológicos consistieron en el aislamiento, identificación y confirmación de enterobacterias presentes en los ambientes estudiados, a partir de los cuales se calcularon los índices de diversidad.

2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Municipio de Aquixtla, localizado en la parte noroeste del estado de Puebla, México; cuyas coordenadas geográficas corresponden a los paralelos 19° 42' 42" y 19° 51' 54" de latitud norte y meridianos 97° 49' 36" y 97° 54' 06" de longitud oeste, con una altitud entre 1800 y 3100 msnm. El clima de Aquixtla se identifica como templado sub húmedo, cuya temperatura media anual oscila de 12 °C a 18 °C y un promedio de precipitación pluvial de 600-900 mm (INAFED, 2007; INEGI, 2008).

Se seleccionaron tres invernaderos de fertirrigación durante el ciclo de cultivo Otoño-Invierno del año 2007, ubicados en las localidades de Aquixtla (Invernadero: 1-*I1*), La Loma (Invernadero: 2-*I2*) y Cuautieco (Invernadero: 3-*I3*) del municipio en estudio. Los invernaderos seleccionados fueron tipo multitúnel con un área destinada para el cultivo de 1000 m² y altura de 6 m, con cubierta de plástico calibre 720 y ventilación lateral (Figura 1).

La fertilización de los suelos consistió en la incorporación de abono orgánico principalmente estiércol crudo, el cual se aplicó en cantidades que oscilaron entre 2 y 3 toneladas por 1000 m².

Toma de muestras de suelo y frutos

Se obtuvieron doce muestras compuestas de suelo, en cuatro puntos diferentes de cada invernadero y a una profundidad de 30 cm según la NOM-021-SEMARNAT (2000). En las plantas de las variedades Reserva y Charleston se muestrearon los frutos con tres grados de madurez (GM), seleccionados según la carta de color de la USDA (USDA, 1991), con la siguiente evaluación visual: 0% (verde maduro), 50% (rosado) y 100% (rojo claro).

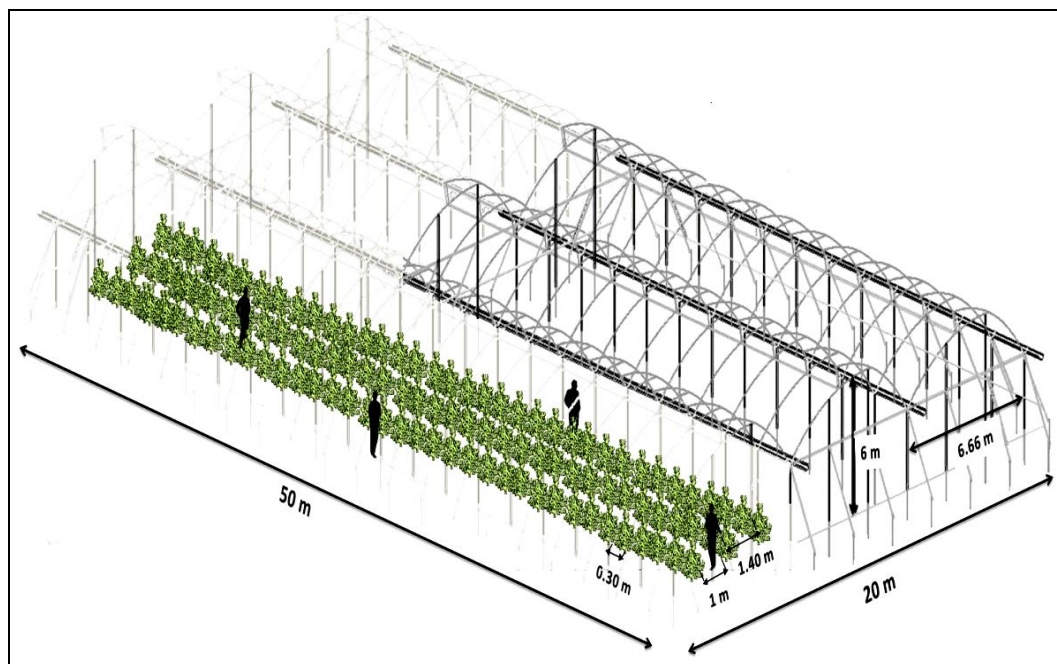


Figura 1. Dimensiones y distribución del invernadero tipo multitúnel con fertirrigación utilizado para el cultivo de tomate.

Se colectaron 162 frutos de tomate, correspondientes a un tamaño de muestra de seis frutos por cada uno de los tres grados de madurez, con tres repeticiones, considerándose 54 frutos por cada invernadero en estudio. Todas las muestras se colectaron en bolsas de plástico estériles y se transportaron en condiciones de refrigeración (12°C), para realizarles los análisis correspondientes dentro de las 24 h posteriores al muestreo.

Caracterización química del suelo

Las mediciones de pH se realizaron en un potenciómetro en los sobrenadantes de las mezclas suelo y agua en una relación 1:2, respectivamente (NOM-021-SEMARNAT 2000). La materia orgánica (%MO) se determinó a través del contenido de carbono orgánico (%C) de acuerdo con el método de Walkley y Black (1947), multiplicando el %C por el factor 1.724.

Aislamiento e Identificación de enterobacterias presentes en suelo y fruto

Para el aislamiento de la microbiota presente en suelo y fruto se utilizaron los siguientes medios de cultivo selectivos y

diferenciales para enterobacterias: Mac Conkey, Salmonella-Shigella, Verde Brillante y Xilosa – Lisina – Desoxicolato (Bioxon Becton Dickinson, México), con incubación a 35 – 37°C durante 24 h. Para la identificación de las enterobacterias, se seleccionaron las morfologías coloniales y se realizaron pruebas bioquímicas básicas IMViC (Prueba de Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato). Las pruebas confirmatorias se llevaron a cabo con el sistema automatizado VITEK (BioMérieux Inc. Missouri, USA), con tarjetas para la identificación de microorganismos Gram negativos GNI (BioMérieux Inc. Missouri, USA).

Específicamente la caracterización genotípica de las cepas de *E. coli* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), identificándose los genes *bfpA* y *lngA* para los patógenos *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC), respectivamente. Se siguieron los protocolos reportados por Ibenyassine *et al.* (2006) y Chávez *et al.* (2007), con algunas modificaciones; para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) las bacterias se sembraron en Agar

Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se obtuvo una suspensión bacteriana y el ADN se liberó por ebullición a 95°C durante 5 minutos; 5 µL de este extracto crudo se utilizó como molde en las diferentes reacciones de amplificación. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL con Go Taq Green Master Mix (Promega M7122), 0.5 µM de cada oligonucleótido y 5 µL del extracto crudo del ADN molde. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos a 94°C por 3 minutos, 47°C por 50 segundos y 72°C por 2 minutos. Se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos, utilizándose un termociclador Mastercycler – Eppendorf. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio en una concentración de 1 µg/mL, para observar las bandas de 326 pb correspondiente al gen *bfpA* y de 708 pb para el gen *lngA*, en un transiluminador de luz UV.

Cálculo de los índices de diversidad de la microbiota

Una vez aisladas e identificadas las especies de enterobacterias presentes en las muestras de suelo y frutos de tomate, se realizó el cálculo de los índices de diversidad (Tabla 1). Los índices son expresiones matemáticas que consideran dos componentes de la estructura de una comunidad: la riqueza (cantidad total de especies presentes) y equitatividad (uniformidad en la distribución de los individuos entre las especies) (Shannon y Weaver, 1949; Chao, 1984; Yuan *et al.*, 2010).

El Índice de Simpson (D) toma en cuenta la abundancia y la riqueza, a partir de cada especie que contribuye al total de la muestra (Begon *et al.*, 1990; Hughes *et al.*, 2001). Asimismo, el Índice de Shannon-Wiener (H') mide la distribución de la abundancia de las especies (Shannon y Weaver, 1949) y el Estimador de Chao

(S_{Chao1}) evalúa “la riqueza total” de acuerdo con el número de especies observadas (Chao, 1984; Chao y Lee, 1992).

Tabla 1

Cálculo de los índices de diversidad a partir de las enterobacterias aisladas en muestras de suelo y fruto.

Índice de Diversidad	Ecuación
Índices de Simpson (D)	$D = 1/\sum p_i^2$
Índice de Shannon-Wiener (H')	$H' = -\sum_{i=1}^s p_i (\ln p_i)$
Estimador de Chao (S _{Chao1})	$S_{Chao1} = s_{obs} + (n1^2/n2^2)$

Donde: p_i = Proporción de individuos de la especie i respecto al total, s = Número de especies, s_{obs} = Número de especies observadas, $n1$ = Número de especies observadas i , $n2$ = Número de especies observadas dos veces.

Análisis estadístico

Considerando que el enfoque de este estudio fue comparar la diversidad de las enterobacterias albergadas en suelo y fruto, el análisis de los resultados se realizó en forma de porcentajes de frecuencia de aislamiento, para cada una de las especies presentes en los ambientes estudiados. Para determinar el grado de asociación entre las variables de las características químicas del suelo (%MO y pH) y los índices de diversidad (H', D y S_{Chao}), se realizaron análisis de correlación valiéndose del coeficiente de Pearson (r).

3. Resultados y discusión

Frecuencia de aislamiento de enterobacterias presentes en suelo y fruto

Los resultados obtenidos en las frecuencias de aislamiento de las enterobacterias presentes en suelo y fruto se muestran en las Figuras 2 y 3.

Entre las enterobacterias aisladas de suelo con mayor frecuencia destacan *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Escherichia coli* (Figura 2). Las colonias

de *E. coli* correspondieron al patógeno enteropatógena (EPEC), considerado como el principal causante de diarrea infantil en países en desarrollo (Torres, 2009). Este mismo patógeno se puede relacionar con el consumo de vegetales crudos contaminados (Norazah *et al.*, 1998). La presencia y sobrevivencia de EPEC en un ambiente extra intestinal, podría explicarse si se considera al suelo como un ecosistema en el que se encuentran los nutrientes en concentraciones adecuadas que favorecen su crecimiento (Ibenyassine *et al.*, 2006).

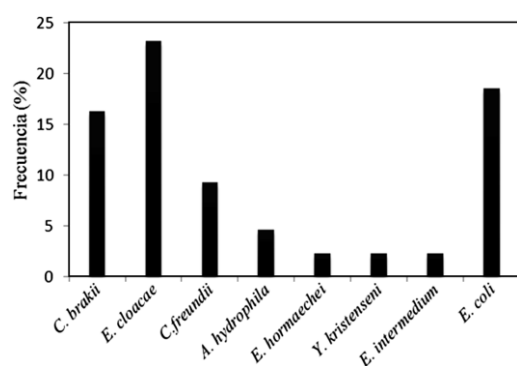


Figura 2. Frecuencia de aislamiento en enterobacterias presentes en muestras compuestas de suelo.

Enterobacter y *Citrobacter* fueron los géneros que se aislaron con mayor frecuencia en los frutos analizados, los cuales podría suponerse forman parte de la microbiota autóctona de los tomates. Entre estas especies, *E. cloacae* se aisló en los tres GM (0, 50 y 100%) mientras que *C. freundii* y *C. brakii* solamente se aislaron en frutos con GM de 50%. Al respecto Sela y Fallik (2009) reportan que especies de la microbiota autóctona de vegetales crudos, pueden ser capaces de secretar enzimas degradativas tipo pectinasas, celulasas y proteasas que favorecen la disponibilidad de nutrientes y propician el desarrollo de las poblaciones microbianas. La acción de estas enzimas está relacionada con la maduración y pérdida de firmeza, parámetros que son decisivos en la calidad de productos vegetales como el tomate (Tucker *et al.*, 1980; Kulia y Gupta,

2006). Los enteropatógenos *Shigella boydii* y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) se identificaron en frutos con 100% de madurez, estadio más cercano al grado óptimo de consumo (Figura 3). Particularmente el patógeno ETEC, es causa común de diarrea del viajero por consumo de ensaladas que involucran vegetales como tomate, cebolla, y pimientos (Beuchat, 1996). Este mismo autor relaciona ambos microorganismos con la falta de calidad sanitaria de vegetales crudos (Beuchat, 2002). Adicionalmente existen diferentes trabajos que documentan la capacidad que tienen los enteropatógenos para internalizarse, crecer dentro de la planta y migrar al fruto. Esta capacidad endofítica les permite resistir los tratamientos de lavado y desinfección, previos al consumo del fruto (Guo *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2002; Iturriaga *et al.*, 2003).

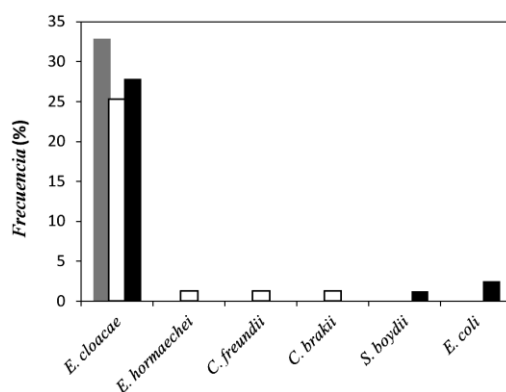


Figura 3. Frecuencia de aislamiento en enterobacterias presentes en frutos de tomate con tres grados de madurez: ■ 0% (verde maduro), □ 50% (inicio pintón) y ■ 100% (rojo claro).

Relaciones de pH, contenido de materia orgánica con índices de diversidad de la microbiota presente en suelo

En la Tabla 2 se presentan los valores de pH, porcentaje de materia orgánica (%MO), índices de diversidad microbiológica (*Simpson (D)* *Shannon-Wiener (H')* *estimador de Chao1 (SChao1)* y la microbiota aislada de muestras obtenidas de suelo provenientes de los tres invernaderos bajo estudio. Los valores

obtenidos de pH y %MO son importantes porque ambas características químicas inducen el crecimiento de la microbiota presente en suelo de cultivo (Abdul-Raouf *et al.*, 1993). En esta investigación, el pH detectado osciló entre 5.6 y 6.6, valores que favorecieron el crecimiento de una gran variedad de enterobacterias (Tabla 2). Según Kolwzan *et al.* (2006) el pH es una característica química decisiva para la solubilidad de los nutrientes presentes en el suelo y su posterior aprovechamiento por la planta. También reportan que el pH óptimo en suelo para el crecimiento bacteriano es el que se encuentra en un intervalo de 6.5 a 8.0. En este estudio los valores de pH registrados fueron ligeramente más ácidos, sin embargo en el invernadero I2 se detectó la presencia del patógeno EPEC cuyo suelo presentó un pH de 5.6. La sobrevivencia de EPEC en las condiciones citadas evidencia la relación del suelo como posible fuente de contaminación microbiológica (Beuchat, 2002).

En cuanto al %MO, Ibarra *et al.* (2007) refieren que suelos que contengan valores de 3 a 4% de MO se consideran suelos ricos. Esta característica de fertilidad

contribuye al buen desarrollo de la planta y eleva la productividad de los cultivos. De acuerdo con los %MO detectados en el suelo del I2 se presentaron valores medios de 3.67%, a partir de los cuales se categoriza como un suelo rico. Esta variable química está correlacionada positivamente ($r=0.7$ y $r=0.9$) con la microbiota presente y sus ID más altos H' y S_{Chao1} : 1.55 y 15.12, respectivamente. La tendencia anterior coincide con lo reportado por Mäder *et al.* (2002), quienes obtuvieron valores mayores de H' en suelos con mayor fertilidad. En los I1 e I3 los %MO difirieron en comparación con I2, estas diferencias se atribuyen a la falta de una fertilización homogénea por parte de los agricultores de la región estudiada (Luna, 2011).

En relación con las enterobacterias halladas en los suelos de los tres invernaderos, destaca el estudio realizado por Baurer y Mathesius (2004), quienes refieren la capacidad de algunos enteropatógenos de coexistir y competir con los demás integrantes de la comunidad bacteriana presente en la rizósfera de la planta.

Tabla 2

Valores medios de pH, %MO, Índices de diversidad y microbiota analizados en suelo.

Invernadero	pH	%MO	ID			Microbiota aislada
			H'	D	S_{Chao1}	
I1	5.87±0.68	2.3±1.27	1.32	3.55	8.16	<i>E. cloacae</i> <i>E. hormaechei</i> <i>C. braakii</i> <i>C. freundii</i> <i>A. hydrophila</i> <i>E. intermedium</i>
I2	5.65±0.11	3.67±0.46	1.55	1.0	15.12	<i>E. cloacae</i> <i>E. coli (EPEC)</i> <i>C. braakii</i> <i>C. freundii</i> <i>E. intermedium</i> <i>Y. kristensenii</i>
I3	6.64±0.47	2.33±1.60	0.67	1.0	5.0	<i>C. braakii</i> <i>C. freundii</i>

ID: Índice de Diversidad, H' : Shannon-Wiener, D: Simpson, S_{Chao1} : Estimador de Chao y %MO: % de Materia Orgánica. I1: Invernadero 1, I2: Invernadero 2, I3: Invernadero 3. En negrita se indican los valores significativos que se discuten en el texto.

Índices de diversidad de la microbiota presente en fruto

Los índices de diversidad calculados a partir de la microbiota aislada en frutos colectados en los tres invernaderos en estudio de detallan en el Tabla 3.

Los índices H' mostraron diferencias en la diversidad de la microbiota presente en los frutos de los invernaderos **I1** y **I3**, sin embargo el patogruppo ETEC fue capaz de coexistir en ambas comunidades microbiológicas. La presencia del enteropatógeno ETEC detectado en este trabajo (Tabla 3), se relaciona con lo reportado por Telias *et al.* (2011), quienes afirman que la inocuidad del tomate se compromete ante la existencia de las enterobacterias mencionadas sobre la superficie del fruto. Lo anterior debido a que el fruto de tomate se consume habitualmente en forma cruda incluyendo su pericarpio.

Con respecto a la evaluación del índice de diversidad " D " Brown y Bowman (2001), refieren que los valores cercanos a 1 indican que son pocas las especies que predominan en la comunidad bacteriana. El comportamiento anterior se puede relacionar con los valores de D obtenidos en los tres invernaderos, como se observa en el Tabla 3. Especialmente en el **I2** se presentaron los índices de D más altos, los cuales se vinculan con la existencia de los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*. La presencia de *Citrobacter* cobra importancia de acuerdo con lo reportado por Abu-Ghazaleh (2006) quien también detectó a este género en agua de riego y suelo de cultivo. Adicionalmente, Tschape *et al.* (1995) y Pereira *et al.* (2010) señalan que los aislamientos de *C. freundii* están relacionados con factores de virulencia homólogos a los descritos por los patogrupos de *E. coli*; asociando a *C. freundii* con casos esporádicos de diarrea infantil.

Para el estimador S_{Chao} , Escalante (2003) sugiere que el índice depende de la abundancia de ciertas especies en la microbiota. En este estudio se pudo

advertir una mayor abundancia de *E. cloacae* en frutos de los tres invernaderos (Tabla 3 y Figura 3); cuya incidencia se asoció notablemente con la maduración firmeza y del fruto.

Tabla 3

Índices de diversidad y microbiota asociada a frutos de tomate recolectados en los invernaderos de estudio.

Inv	ID			Microbiota Aislada
	H'	D	S_{Chao1}	
I 1	0.25	1.12	40	<i>E. cloacae</i> <i>S. boydii</i> <i>E. coli</i> (ETEC)
I 2	0.41	1.42	33	<i>E. cloacae</i> <i>C. braakii</i> <i>C. freundii</i>
I 3	0.40	1.0	21	<i>E. cloacae</i> <i>E. hormaechei</i> <i>E. coli</i> (ETEC)

Inv: Invernadero. ID: Índices de diversidad: H' : Shannon-Wiener, D: Simpson, S_{Chao1} : Estimador de Chao. **I1**: Invernadero 1, **I2**: Invernadero 2, **I3**: Invernadero 3. En negritas se indican los valores significativos que se discuten en el texto.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la presencia de diferentes especies de enterobacterias en fruto y suelo determina que ambos sitios pueden significar "nichos" idóneos para el crecimiento de una microbiota diversa, tal como lo reflejaron los índices de diversidad Shannon-Wiener (H') y de Simpson (D). Las bacterias identificadas con mayor frecuencia, tanto en tomate y suelo, fueron *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Escherichia coli* con los patogrupos enteropatógena y enterotoxigénica. Las correlaciones positivas entre los porcentajes de materia orgánica y los índices H' reflejaron la riqueza de los suelos. Sin embargo se pudo evidenciar que la fertilización de los suelos con abono orgánico, llega a constituir una fuente de contaminación por algunos enteropatógenos. Los aislamientos de *Shigella boydii* y *E. coli* en frutos con grado de madurez de consumo, deben considerarse para el

desarrollo de estrategias, que estén encaminadas a dar cumplimiento con los requisitos de inocuidad de productos frescos como el tomate. Finalmente con los resultados de este trabajo no sólo se beneficia a la región de estudio, sino que muestran en general la diversidad de las enterobacterias que pueden llegar a alojarse, bajo condiciones de cultivo de tomate evaluadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por los productores de tomate de la región Aquixtla, Puebla, México. Asimismo agradecen a la Fundación Produce Puebla, el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación con el proyecto: “Determinación de la rentabilidad económica y caracterización fitoquímica de jitomate bajo diferentes sistemas de producción y ambientes en el Estado de Puebla”. No. de Folio 21-2007-0303.

Referencias bibliográficas

- Abdul-Raouf, U.M.; Beuchat, L.R.; Ammar, M. S. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* 0157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1999–2006.
- Abu-Ghazaleh, B. M. 2006. Inhibition of *Citrobacter freundii* by lactic acid, ascorbic acid, citric acid, *Thymus vulgaris* extract and NaCl at 31 °C and 5 °C. *Annals of Microbiology* 56: 261-267.
- Baurer, W.; Mathesius, U. 2004. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Current Opinion in Plant Biology* 7:429-433.
- Begon, M.; Harper, J.; Townsend, C. R. 1990. *Ecology Individuals, Populations and Communities*, Blackwell Scientific Publications, UK, pp: 929.
- Berger, C. N.; Sodha, S. V.; Shaw, R. K.; Griffin, P.M.; Pink, D.; Hand, P.; Frankel, G. 2010. Fresh fruits and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12: 2385–2397.
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59:204–216.
- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4:413-423.
- Brandt, S.; Pek, Z.; Barna, E. 2006. Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:568-572.
- Brown, M. V.; Bowman, J. P. 2001. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiology Ecology* 35: 267-275.
- Chávez, E.; Martínez, L.; Cedillo, M.; Gil C.; Avelino, F.; Castañeda, E. 2007. Identificación de cepas de ECET de diferentes ambientes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 27:70-74.
- Chao, A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population, *Scandinavian Journal of statistics* 11: 265-270.
- Chao, A.; Lee, S. M. 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* 87: 210-217.
- Escalante, T. E. 2003. ¿Cuántas especies hay? Los estimadores no paramétricos de Chao, *Elementos Ciencia y Cultura* 52: 53-56.
- Escartín, F. E. 2000. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Editorial: Universidad Autónoma de Querétaro, México, pp: 520-527.
- Guo, X.; Chen, J.; Brackett, R. E.; Beuchat, L. R. 2001. Survival of salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4760–4764.
- Harris, L. J.; Farber, J. M.; Beuchat, L. R.; Parish, M. E.; Suslow, T. V.; Garrett, E. H.; Busta, F. F. 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:78-141.
- Hughes, J. B.; Hellman, J.; Ricketts, T. H.; Bohannon, B. J. 2001. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4399-4406.
- Ibarra, C.; Ruiz, C. D.; Flores, G. J. A.; González, J. G.; Eguiarte, D. R. 2007. Distribución espacial del contenido de materia orgánica de los suelos agrícolas de Zapopan, Jalisco. *Terra Latinoamericana* 25: 187-194.
- Ibenyassine, K.; AitMhand, R.; Karamoko, Y.; Cohen, N.; Ennaji, M. M. 2006. Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of enteropathogenic *Escherichia coli* in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated irrigation water. *Letters in Applied Microbiology* 43: 528–533.
- Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal (INAFED). *In: Enciclopedia de los municipios de México*, Puebla, México. 2007. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx>.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2008. Superficie sembradas y cosechadas por tipo de cultivo, principales cultivos y municipios según disponibilidad de agua. *Anuario Estadístico del Estado de Puebla*, pp 1384-1395.
- Iturriaga, M.; Escartín, F.; Beuchat, L. 2003. Effect of Inoculum Size, Relative Humidity, Storage Temperature, and Ripening Stage on the Attachment of *Salmonella* Montevideo to Tomatoes and Tomatillos. *Journal of Food Protection* 66:1756-1761.
- Iturriaga, M.; Tamplin, M.; Escartín, F. 2007. Colonization of Tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative and storage temperature. *Journal of Food Protection* 70: 30-34.
- Juroszek, P.; Lumpkin, H. M.; Yang, R. Y.; Ledesma, D. R.; Ma, C. H. 2009. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison of organic and conventional management systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1188-1194.
- Kolwzan, B.; Adamiak, W.; Grabas, K.; Pawelczyk, A. 2006. *Microbiology of soil. Introduction to environmental microbiology*. Editorial Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej pp 7-17.

- Kulia, A.; Gupta, R. P. 2006. Fruit Microbiology. Hand book of fruits and fruits processing, Editorial: Blackwell Publishing, Australia.
- Leonardi, C.; Ambrosino, P.; Esposito, F.; Fogliano, V. 2000. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4723-4727.
- Luna, G. M. L.; Luna, G. J. J., Spencer, M. G. 2006. El ABC para la Seguridad Alimentaria en los Hogares. Editorial Educación y Cultura, México, pp 74-77.
- Luna, G. M. L. 2011. Diagnóstico Sistemático sobre los invernaderos del Municipio de Aquixtla, Puebla. Tesis doctoral: Producción de autoinductores y biopelículas microbianas y su relación con la calidad y composición química de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivado en la región de Aquixtla, Puebla.
- Mäder, P.; Fliessbach, A.; Dubois, D.; Gunst, L.; Fried, P.; Niggli, U. 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296: 1694-1697.
- Mukherjee, A.; Speh, D.; Jones, A.T.; Buesing, K. M.; Diez, G. F. 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection* 69: 1928-1936.
- Norma Oficial Mexicana, Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos, Estudio, Muestreo y Análisis (NOM-021-SEMARNAT). 2000. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM-021-RECNAT-2000.pdf>.
- Norazah, A.; Rahizan, I.; Zainulidin, T.; Rohani, M. Y. 1998. Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked food. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 29: 91-103.
- Orozco, L.; Rico, R. E.; Fernandez, E. E. 2008. Microbiological Profile of Greenhouses in a Farm Producing Hydroponic Tomatoes. *Journal of Food Protection* 1: 60-65.
- Pereira, A. L.; Silva, T. N.; Gomes, A.; Araujo, A. C. G.; Giugliano, L. G. 2010. Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *The Journal of Microbiology* 10: 3-18.
- Raffo, A.; Leonardi, C.; Fogliano, V.; Ambrosino, P.; Salucci, M.; Gennaro, L.; Burgianesi, R.; Quaglia, G. 2002. Nutritional value of Cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* C.v. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6550-6556.
- Sela, S.; Fallik, F. 2009. Microbial Quality and Safety of Fresh Produce: Postharvest Handling. Editorial Elsevier. pp: 356-371.
- Shannon, C. E.; Weaver, W. 1949. The Mathematical Theory of Communication. Editorial: University Illinois Press, Urbana IL, USA.
- Smith, J. L.; Fratamico, P. M. 2005. Diarrhea-inducing *Escherichia coli*. Foodborne pathogens-microbiology and molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, U.K. pp: 357-82.
- Solomon, E. B.; Yaron, S.; Mathews, R. K. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 397-400.
- Telias, A.; White, J. R.; Pah, D. M.; Ottesen, A., R., Walsh, C. S. 2011. Bacterial community diversity and variation in spray water sources and the tomato fruit surface. *Bio Med Central Microbiology* 81:11-13.
- Torres, T. A. 2009. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases. Editorial Elsevier, California, USA, pp: 1013-1028.
- Tschape, H.; Prager, R.; Streckel, W.; Fruth, A.; Tietze, E.; Bohme, G. 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of hemolytic uremic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology and Infection* 114: 441-450.
- Tucker, G.; Robertson, N.; Grierson, D, 1980. Changes in polygalacturonase isoenzymes during the ripening of normal and mutant tomato fruit. *European Journal of Biochemistry* 112:119-124.
- United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes (USDA). 1991. Disponible en: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/standards>.
- Walkley, A.; Black, I.A. 1947. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63(4):251-264.
- Willcox, J. K.; Catignani, G. L.; Lazarus S. 2003. Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 1-8.
- Yuan, X.; Xu Chai, J. H.; Lin, H.; Yang, Y.; Woand, X.; Shi, J. 2010. Differences of rhizobacterial diversity and the content of peimine and peiminine of *Fritillaria thunbergii* among different habits. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 465-470.

